

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590756

研究課題名（和文） 膵発癌における PI3K シグナル活性化の役割

研究課題名（英文） The impact of activated PI3K signal on pancreatic cancer

研究代表者

笹平 直樹（SASAHIRA NAOKI）

東京大学医学部附属病院・臨床登録医

研究者番号：30401102

研究成果の概要（和文）：膵臓特異的に活性化 *Kras* を発現、*Pten* をノックアウトしたマウスを作成した。このマウスは膵臓に腫瘍を形成し、6 週齢で死に至ることがわかった。*PTEN* 欠失および *AKT2* 増幅を認める膵癌細胞株において mTOR 阻害剤ラパマイシンは単剤およびジェムシタビンとの併用でも抗腫瘍効果を認めなかった。これらの細胞は糖飢餓ではアポトーシスに至ることを見出したが、この状態ではラパマイシンの投与を行うとむしろアポトーシスが抑制された。以上の結果により、mTOR 阻害剤が抗腫瘍的に働かない状況があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We generated pancreatic cancer mouse model by inducing pancreas-specific expression of activated *Kras* and deletion of *Pten*. All the mice died from pancreas tumor in six weeks. We analyzed the effect of mTOR inhibitor, rapamycin, on pancreatic cancer cell lines with *PTEN* deletion or *AKT2* amplification. Rapamycin had no anti-tumor effect using as a single agent or combination with gemcitabine. We discovered that low glucose medium predisposed these cells to apoptosis and rapamycin prevented this phenomenon. The result suggested that, under some conditions, mTOR inhibition could not exert anti-tumor effect even on *PTEN*-*PI3K*-*AKT* activated cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：膵癌、マウスモデル、薬剤耐性、遺伝子異常

1. 研究開始当初の背景

マウス膵発癌モデルの進歩 膵癌は難治癌の最たるものであり、その病態の解明・治療法の開発は急務である。近年遺伝子改変マウスを用い、ヒトの膵癌を近似する発癌モデルが作成された（Hingorani et al., Cancer Cell

2003 & 2005; Aguirre et al., Genes Dev 2003; Bardeesy et al., PNAS 2006)。これらでは、ヒト膵癌で9割以上に認められる恒常活性型 *Kras* 遺伝子(*KrasG12D*)を発現させており、これによりまず前癌病変 PanIN (pancreatic intraepithelial neoplasm)が

現する。それに加えて p16、p53 等ヒト膵癌でみられる腫瘍抑制遺伝子の異常を導入することにより、進行癌への進展が促進され、転移・浸潤能も獲得する。ヒトの膵癌は、このような遺伝子異常の蓄積に伴い PanIN から浸潤癌へと多段階に発癌すると考えられており (Hruban et al., Am J Surg Pathol 2001)、上記のマウスモデルもこれを模倣していると考えられた(Hruban et al., Cancer Res 2006)。

分担研究者である伊地知は、*Kras*^{G12D} 発現と TGF-β II 型受容体(*Tgfr2*)ノックアウトを同時に起こすマウスを作成し、全例において分化型腺癌を得た (Ijichi et al., Genes Dev 2006)。このマウスは、これまで報告されたモデルの中で、ヒト通常型膵癌の組織像に最も類似したモデルであった。

膵癌における前癌病変からの多様な発癌パターンとマウスモデル

通常型膵癌の発癌のメインルートは PanIN からの発癌と考えられ、この最初の段階が *Kras* 変異であると推定されている。実際、通常型膵癌の 9 割以上に *Kras* 変異を伴うことから、今までのモデルの多くは、恒常活性型 *Kras* 遺伝子を利用したモデルであった。臨床的には、膵癌の前癌病変として、PanIN の他に IPMN(intraductal papillary mucinous neoplasm)、MCN(mucinous cystic neoplasm)という 2 種の嚢胞性病変の存在が知られている。特に IPMN は PanIN と類似する病態と考えられる面があるが、PanIN が微小膵管における変化であり基本的に画像診断では捉えられないのに対し、IPMN は嚢胞性病変として捉えられるため、膵癌の早期診断につながる可能性がある。近年、IPMN にも複数のタイプがあることが明らかになりつつあり、主膵管型は adenoma-carcinoma sequence により IPMN がそのまま癌化する経過を辿るのに対し、分枝膵管型は IPMN と離れた部位に PanIN を介する通常型膵癌が合併する膵癌の高危険群ではないかという説が強まってきている。IPMN を呈するマウスモデルとして *Ptf1a*^{cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Smad4*^{flx/flx} マウスがあり (Bardeesy et al., Genes Dev, 2006)、これは主膵管型と分枝膵管型の双方の発癌プロセスを呈するモデルである。

多様な膵発癌パターンにおける PI3K シグナルの役割 われわれの検討では、主膵管型 IPMN を多く認める MUC2 陽性腸型 IPMN では、通常型膵癌と比較し、*Kras* 変異が少ないことがわかっており、異なる発癌経路の関与が疑われる。この腸型の IPMN では、頻度は低いながら、通常型膵癌ではほとんど認めない PIK3CA の活性化変異を認めることもわかっている。一方で、通常型膵癌で、*Kras* 変異を認める腫瘍でも、PI3K シグナルの活

性をきたす PTEN の機能喪失や AKT2 の増幅などをしばしば認め、癌化に関わるという報告を多数認める。しかし、PI3K シグナルは、*Kras* の活性化と重複する増殖・生存のシグナルであり、その必要性は不明である。PI3K シグナル異常による膵癌マウスモデルに関しては、PDX1 プロモーター下に Cre recombinase を発現させた *Pten* の膵臓特異的コンディショナルノックアウトマウスの報告がある。

2. 研究の目的

Kras 変異がある状況において、膵癌における PI3K シグナルの活性化の影響を検討することを目的とした。この目的のために *Ptf1a*^{cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pten*^{flx/flx} マウスを作成する。非常に進行のはやい腫瘍を生み出すことが予想される。今回の研究期間内に PI3K シグナルの活性化を伴うマウスの表現型を腫瘍細胞としてだけではなく、腫瘍血管を含めた微小環境の違いとしても明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) *Ptf1a*^{cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pten*^{flx/flx} マウスの作成

目的の遺伝子型のマウス *Ptf1a*^{cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}; *Pten*^{flx/flx} を *Ptf1a*^{cre/+}; *Pten*^{flx/flx} と *LSL-Kras*^{G12D/+};*Pten*^{flx/flx} との交配により得る。表現型を解析する。

2)-① SNP アレイを用いて PI3K シグナルの異常を伴う膵癌細胞株を見出す

Affymetrix 社の GeneChip Human Mapping 100k Set アレイでは、SNPs 判定に用いたプローブのシグナル強度とデータ解析ソフトとして CNAG を使用することで、従来の CGH array 等 (1 Mb 程度) より高解像度で、より小さい増幅、欠失領域の検出が可能であり、さらに、SNP call の有無で LOH の有無が判定できる。膵癌細胞株ゲノム DNA を抽出し、100 k または 500 k chip を用いて、共通の遺伝子増幅および欠失領域や LOH の有無を網羅的に解析する。

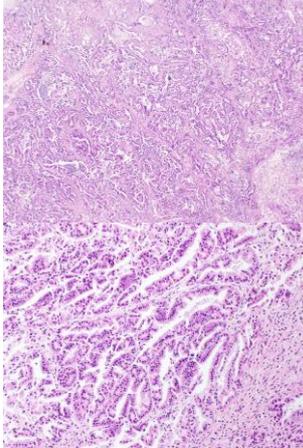
この方法を用いて見出した増幅、欠失に関して、western blotting でタンパクレベルでの異常を確認する。

2)-② mTOR 阻害剤の効果のバイオマーカーになるか検討する

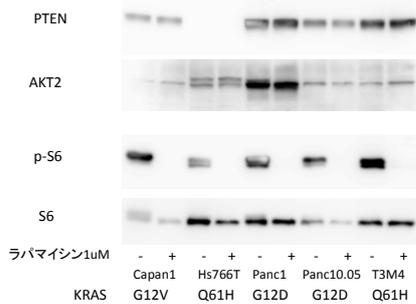
mTOR 阻害剤は腎細胞癌ではすでに臨床で用いられており、効果が証明されている。PI3K シグナルの異常を通常型膵癌より頻繁に認める膵内分泌腫瘍においても mTOR 阻害剤の効果が確認されている。そこで、このシグナルの異常を伴う膵癌細胞株において mTOR 阻害剤ラパマイシンの効果をみた。MTT アッセイにて細胞増殖への影響、ゲムシタビン併用での効果も検討した。また、そのほかラパマイシン投与により表現型を呈する条件を検討した。

4. 研究成果

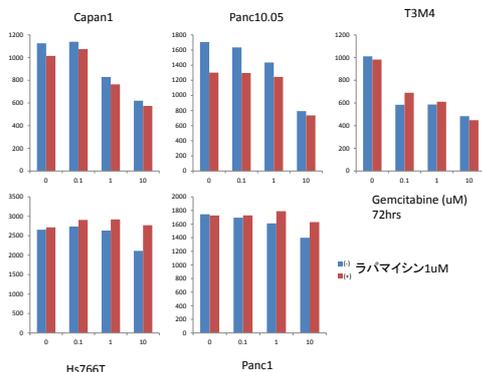
1) 膵臓特異的に活性化 KRAS を発現、PTEN をノックアウトしたマウスを作成した。このマウスは膵臓に腫瘍を形成し、6 週齢で死に至ることがわかった (下図、膵腫瘍病理)。



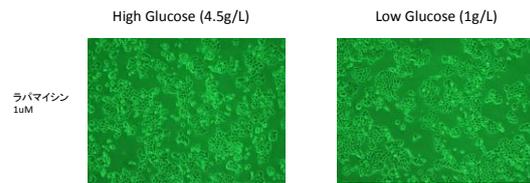
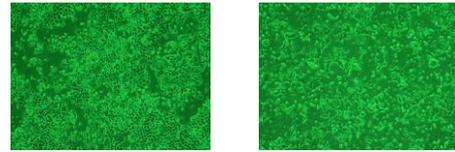
2)-①膵癌細胞株の SNP アレイを用いたゲノム解析の結果を参照し、PTEN が欠失した細胞 (Hs766T) および AKT2 の増幅を認める膵癌細胞株(PANC1)を見出した。Western blotting にて蛋白レベルでの発現も確認した。



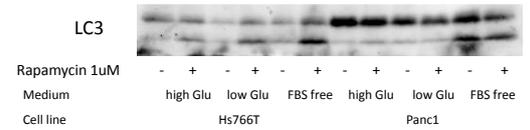
2)-② KRAS とともに PTEN-PI3K-AKT-mTOR パスウェイが活性化したこれらの細胞株で mTOR 阻害剤ラパマイシンの効果を調べた。単剤およびジェムシタビンの併用でも抗腫瘍効果は明らかでなかった。



これらの細胞は 4.5g/L の高グルコース培養液で培養するところ、1g/L の低グルコース培養液ではアポトーシスに至ることがわかり、グルコース要求度が高く、解糖系に依存していると考えられた。



この状態ではラパマイシンの投与を行うとアポトーシスが抑制されることがわかり、オートファジーの誘導が関与している可能性があった。



以上の結果より、PTEN-PI3K シグナルが恒常的に活性化している癌細胞においても状況により mTOR 阻害剤が抗腫瘍的に働かない可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

① Impact of S-1 in patients with gemcitabine-refractory pancreatic cancer in Japan. Nakai Y, Isayama H, Sasaki T, Sasahira N, Kogure H, Hirano K, Tsujino T, Ijichi H, Tateishi K, Tada M, Omata M, Koike K. Jpn J Clin Oncol. 査読有 2010 Aug;40(8):774-80. doi: 10.1093/jco/hyq059.

② Impact of S-1 on the survival of patients with advanced pancreatic cancer. Nakai Y, Isayama H, Sasaki T, Sasahira N, Ito Y, Kogure H, Togawa O, Matsubara S, Arizumi T, Yagioka H, Yashima Y, Kawakubo K, Mizuno S, Yamamoto K, Hirano K, Tsujino T, Ijichi H, Tateishi K, Toda N, Tada M, Omata M, Koike K. Pancreas. 査読有 2010 Oct;39(7):989-93. doi: 10.1097/MPA.0b013e3181d91936.

③ A genetic polymorphism of CYP2C19 is associated with susceptibility to biliary tract cancer. Isomura Y, Yamaji Y, Ohta M, Seto M, Asaoka Y, Tanaka Y, Sasaki T, Nakai Y, Sasahira N, Isayama H, Tada M, Yoshida H, Kawabe T, Omata M, Koike K. J Gastroenterol. 査読有 2010 Oct;45(10):1045-52. doi: 10.1007/s00535-010-0246-0.

④ Comorbidity, not age, is prognostic in

patients with advanced pancreatic cancer receiving gemcitabine-based chemotherapy.

Nakai Y, Isayama H, Sasaki T, Sasahira N, Tsujino T, Kogure H, Yagioka H, Yashima Y, Togawa O, Arizumi T, Matsubara S, Hirano K, Tada M, Omata M, Koike K. Crit Rev Oncol Hematol. 査読有 2011 Jun;78(3):252-9. doi: 10.1016/j.critrevonc.2010.05.007.

⑤ Incidence of extrapancreatic malignancies in patients with intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. Kawakubo K, Tada M, Isayama H, Sasahira N, Nakai Y, Yamamoto K, Kogure H, Sasaki T, Hirano K, Ijichi H, Tateishi K, Yoshida H, Koike K. Gut. 査読有 2011 Sep;60(9):1249-53. doi: 10.1136/gut.2010.227306.

⑥ Specific increase in serum autotaxin activity in patients with pancreatic cancer. Nakai Y, Ikeda H, Nakamura K, Kume Y, Fujishiro M, Sasahira N, Hirano K, Isayama H, Tada M, Kawabe T, Komatsu Y, Omata M, Aoki J, Koike K, Yatomi Y. Clin Biochem. 査読有 2011 Jun;44(8-9):576-81. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2011.03.128.

⑦ Gemcitabine and oxaliplatin combination chemotherapy for patients with refractory pancreatic cancer. Isayama H, Nakai Y, Yamamoto K, Sasaki T, Mizuno S, Yagioka H, Yashima Y, Kawakubo K, Kogure H, Arizumi T, Togawa O, Ito Y, Matsubara S, Yamamoto N, Sasahira N, Hirano K, Tsujino T, Tada M, Omata M, Koike K. Oncology. 査読有 2011;80(1-2):97-101. doi: 10.1159/000328767.

⑧ Inhibiting Cxcr2 disrupts tumor-stromal interactions and improves survival in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma.

Ijichi H, Chytil A, Gorska AE, Aakre ME, Bieri B, Tada M, Mohri D, Miyabayashi K, Asaoka Y, Maeda S, Ikenoue T, Tateishi K, Wright CV, Koike K, Omata M, Moses HL. J Clin Invest. 査読有 2011 Oct;121(10):4106-17. doi: 10.1172/JCI42754. Epub 2011 Sep 19.

⑨ Different subtypes of intraductal papillary mucinous neoplasm in the pancreas have distinct pathways to pancreatic cancer progression.

Mohri D, Asaoka Y, Ijichi H, Miyabayashi K, Kudo Y, Seto M, Ohta M, Tada M, Tanaka Y, Ikenoue T, Tateishi K, Isayama

H, Kanai F, Fukushima N, Tada M, Kawabe T, Omata M, Koike K.

J Gastroenterol. 査読有 2012 Feb;47(2):203-13. doi: 10.1007/s00535-011-0482-y.

⑩ Phase I trial of gemcitabine and candesartan combination therapy in normotensive patients with advanced pancreatic cancer: GECA1.

Nakai Y, Isayama H, Ijichi H, Sasaki T, Kogure H, Yagioka H, Miyabayashi K, Mizuno S, Yamamoto K, Mouri D, Kawakubo K, Yamamoto N, Hirano K, Sasahira N, Tateishi K, Tada M, Koike K. Cancer Sci. 査読有 2012 Aug;103(8):1489-92. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02311.x.

[学会発表] (計 2 件)

① Sasahira N. Fully covered self-expandable metal stent (FCSEMS) for refractory pancreatic duct stricture associated with chronic pancreatitis. Asian Pacific Digestive Week 2010. 2010年9月19-22日、Kuala Lumpur, Malaysia

② Sasahira N. Eose extracorporeal shockwave lithotripsy combined with endotherapy really improve the natural course of chronic pancreatitis? Digestive Disease Week (DDW). 2011年5月7-10日、Chicago, IL, USA

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹平 直樹 (SASAHIRA NAOKI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30401102

(2) 研究分担者

多田 稔 (TADA MINORU)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：80302719

(3) 連携研究者

池上 恒雄 (IKENOUE TSUNEO)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：80396712

(4) 研究分担者

伊地知 秀明 (IJICHI HIDEAKI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70463841

(5) 研究分担者

浅岡 良成 (ASAOKA YOSHINARI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90431858